

Infliksimabihoitoon vaikutus veren valkosolujen geeniekspressioon tulehduksellisissa suolistosairauksissa

Moona Hämäläinen

Lääketieteen kandidaatti

Immunobiologian tutkimusohjelmayksikkö

Helsinki 28.5.2019

Tutkielma

moona.hamalainen@helsinki.fi

Ohjaaja: Päivi Saavalainen

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme	
Lääketieteellinen tiedekunta		Lääketieteen koulutusohjelma (ruotsinkielinen)	
Tekijä – Författare – Author			
Moona Hämäläinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Infliksimabihoidon vaikutus veren valkosolujen geeniekspressioon tulehduksellisissa suolistosairauksissa			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track			
Immunologia			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages	
Syventävät opinnot	28.5.2019	28+1	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Suomessa tulehduksellisten suolistosairauksien esiintyvyys on kasvussa. Yksi toissijaisista lääkkeistä sairauteen on biologinen lääke infliksimabi, joka on TNF-alfa-estäjä. TNF-alfa on tärkeä sytokiini tulehduksellisissa sairauksissa.</p> <p>Infliksimabista vain noin 1/3 saa hyvän hoitovasteen. 1/3 ei saa vastetta ollenkaan, ja 1/3 menettää saadun vasteen, eikä vastetta osata ennustaa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli etsiä biomarkkereita geeniekspressioprofiileista RNA-sekvensoinnilla ja ymmärtää erilaisten lääkevasteiden eroja.</p> <p>Tutkimuksessa tutkittiin 15 potilaan veren valkosolujen geeniekspressioita ennen (0vk) ja jälkeen (12vk) infliksimabihoidon, sekä verrattiin vasteensaajien ja ei-vasteensaajien geeniekspressioiden profiileja.</p> <p>RNA eristettiin näytteistä, sekvensoitiin ja analysoitiin Chipster-ohjelmalla. Ekspressiotasot erosivat merkitsevästi aikapisteiden välillä 17 geenin osalta, joista tärkein on DUSP2-geeni. DUSP2 laskee epäsuorasti interleukiini-17 pitoisuutta, jolloin tulehdusreaktio vaimenee. Verrattaessa vasteensaajien ja osittaisen vasteensaajien geeniekspressioprofiileja ennen ja jälkeen hoidon, ei selvää trendiä näkynyt geenien ilmentymisessä. Tutkimuksessa ei ollut mukana 12 viikon näytteitä ei-vasteensaajilla, joten siihen ei voitu verrata.</p> <p>Tässä tutkimuksessa ei löytynyt biomarkkeria infliksimabin hoitovasteen ennustamiselle, mutta saatiin tärkeää tietoa DUSP2-geenin aktiivisuudesta. Kaikilla infliksimabihoidon saaneilla DUSP2-geenin ekspressio nousi veressä.</p> <p>(Sanoja 154)</p>			

Avainsanat – Nyckelord – Keywords Inflammatory bowel disease; Infliximab; RNA sequencing
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Päivi Saavalainen
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Terkko, Helda
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme	
Medicinska fakulteten		Utbildningsprogrammet för medicin (svenskspråkig)	
Tekijä – Författare – Author			
Moona Hämäläinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Infliximabbehandlingens påverkan på vita blodkropparnas genexpression hos inflammatoriska tarmsjukdomar			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track			
Immunologi			
Työn laji – Arbetets art – Level		Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Fördjupade studier		28.5.2019	28+1
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>I Finland har incidensen av inflammatoriska tarmsjukdomar ökat. En andrahandsmedicin för sjukdomen är biologiska läkemedlet infliximab, som är en TNF-alfa-blockerare. TNF-alfa är en viktig cytokin bland inflammatoriska sjukdomar.</p> <p>På infliximabbehandlingens svarar bara 1/3 bra. 1/3 får ingen respons alls och 1/3 förlorar responsen de fått. Man kan inte förutsäga hurdan responsen blir. Avsikten med denna undersökning var att hitta biomarkörer från genexpressionsprofilen med hjälp av RNA-sekvensering och förstå skillnaden mellan olika terapier.</p> <p>I denna studie undersökte man vita blodkroppars genexpression av 15 patienter före (0 veckor) och efter (12 veckor) infliximabbehandling, och jämförde genexpressionsprofiler mellan de som svarade och de som inte svarade på behandlingen.</p> <p>RNA isolerades från proven, sekvenserades och analyserades med Chipster-programmet. Expressionsnivåerna i de olika tidpunkterna avvek tydligt hos 17 gener, varav den viktigaste var DUSP2. DUSP2 sänker indirekt koncentrationen av interleukin-17 varvid inflammationsreaktionen minskar. När man jämför genexpressionsprofiler före och efter behandlingen mellan de som fick en god respons och de som fick en delvis respons, hittades ingen tydlig trend i genernas uttryck. I studien fanns det inte 12-veckors prov av de som inte fick någon respons alls och därmed inte kunde jämföras.</p> <p>I denna studie hittades inga biomarkörer för responsen av infliximab, men man fick viktig information om aktiviteten av DUSP2. Hos alla som fick infliximabbehandling ökade DUSP2-genens uttryck i blodet. (216 ord)</p>			

Avainsanat – Nyckelord – Keywords Inflammatory bowel disease; Infliximab; RNA sequencing
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Päivi Saavalainen
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Terkko, Helda
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO.....	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	1
2.1	IBD	2
2.2	CROHNIN TAUTI.....	2
2.3	HAAVAINEN KOLIITTI	3
2.4	TNF-A	3
2.5	BIOLOGISET LÄÄKKEET	4
2.6	INFLIKSIMABIN HOITOVASTE.....	5
3	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	5
4	TUTKIMUSAINEISTO JA –MENETELMÄT.....	6
4.1	POTILASAINEISTO.....	6
4.2	LÄÄKEVASTEEN LUOKITTELU.....	6
5	MENETELMÄT	7
5.1	VALKOSOLUNÄYTTEIDEN KÄSITTELY	7
5.2	RNA-ERISTYS JA CDNA-KÄÄNTÖ	8
5.3	CDNAN MONISTUS JA SEKVENSOINTIKIRJASTON VALMISTUS	9
5.4	NÄYTTEIDEN YHDISTÄMINEN.....	9
5.5	PUHDISTUS	10
5.6	TAGMENTAATIO	11
6	TULOKSET	16
6.1	GEENIEKSPRESSIOIDEN VERTAILUA	16
6.2	ERCC	16
6.3	POIKKEAVAT GEENIT	18
6.4	DUSP2-GEENI	19
6.5	TH17-SOLU	19
6.6	SIGNALOINTI	20
6.7	GEENIEKSPRESSIOIDEN EROT HOIDON ALUSSA JA 12 VIIKOLLA	21
7	POHDINTA	25
	LÄHDELUETTELO.....	27

1 Johdanto

Tässä tutkielmassa selvitetään tulehduksellisten suolistosairauksien (IBD) biologisen lääkeaineen, infliksimabin, molekyylibiologista vastetta. Tutkimus toteutetaan Helsingin Yliopiston immunobiologian tutkimusohjelmassa Päivi Saavalaisen ryhmässä.

Tutkimuksessa on mukana IBD-potilaita, jotka saavat infliksimabihoitoa sairauteensa. Verinäytteistä eristetään valkosolut, joista mitataan geeniekspressiot RNA-sekvensoinnilla.

Tutkielma alkaa tutkimuksen tavoitteilla ja kirjallisuuskatsauksella, jossa käsitellään tulehduksellisten suolistosairauksien patologiaa, esiintyvyyttä ja diagnosointia, sekä IBD:ssä käytettyjä biologisia lääkkeitä. Aineistossa ja menetelmissä käydään läpi tutkimuksen verinäytteiden alkuperä ja käsittelyn menettelytavat. Lopuksi tutkielmassa keskustellaan tuloksista ja pohditaan niiden merkitystä.

2 Kirjallisuuskatsaus

Tulehdukselliset suolistosairaudet (Inflammatory Bowel Disease, IBD) ovat Crohnin tauti (Morbus Crohn, CD) ja haavainen koliitti (Colitis ulcerosa, UC), jotka molemmat haavoittavat suolistoa eri kohdista. Suomessa IBD-diagnoosin saaneita potilaita on yli 46 000, ja vuosittain uuden IBD-diagnoosin saa yli 2000. IBD:n esiintyvyys Suomessa on miltei kolminkertaistunut 15 vuodessa 1993 (216 diagnoosin saanutta 100 000 asukasta kohden) ja 2008 (595/100 000) välillä. (1) (2) (3)

2.1 IBD

Tulehduksellinen suolistosairaus on parantumaton krooninen suoliston tulehdustauti, jonka alkuperä on tuntematon. Sen uskotaan saavan alkunsa virheellisestä puolustusreaktiosta, jonka laukaisee eri ympäristötekijät, kuten lääkeaineet, myrkyt, tulehdukset ja suolistomikrobit. Tiettyjen geenien on tutkittu altistavan sairastumiselle, mutta IBD ei ole monogeeninen sairaus. (4)

2.2 Crohnin tauti

Crohnin tauti kohdistuu yleensä ohutsuolen terminaaliseen ileumiin ja oikeanpuoleiseen paksusuoleen, mutta voi myös vahingoittaa kaikkia suoliston osia suusta perianaalin alueelle(5). Tautikuvaan kuuluu limakalvon haavaumat ja tulehdus, mikä voi aiheuttaa suoliston turvotusta (4). Tulehdus on transmuraalinen, eli se voi yltää suoliston kaikkien kerrosten läpi (mukoosa, submukoosa, limakalvon lihaskerros ja seroosa). 10–30% Crohnin tautia sairastaville aiheutuu transmuraalisen tulehduksen takia spontaanisti absesseja, jonka ontelot voivat aiheuttaa fisteleitä. (6) Tulehduksen edetessä syntyy ei-kaseaatioivia granuloomia, jotka todetaan histologisessa näytteessä. Aktiivisimman oireilun jälkeen haavat korvaantuvat arpikudoksella. Immuunipuolustuksen aiheuttama reaktio on sekä luonnollista ja hankittua immunitettä. Suoliston makrofaagit, neutrofiilit ja T-solut edistävät tulehdusvälittäjäaineiden, kuten TNF- α , IL-2, IL-12 ja IL-18, aktivaatiota. (4)

Taudin kliiniset oireet ovat krooninen (yli 4 viikkoa kestävä) ripuli, joka voi olla veristä tai limaista, oikeanpuoleisen alavatsan kivut, turvotus, painonlasku, kuume ja anemia (4). Crohnin taudin ekstraintestinaalit ilmenemismuodot ovat muun muassa episkleriitti, uveiitti, stomatiitti, aftainen haavauma, artriitti, sakroiliitti, erythema nodosum ja haavautuva ihotulehdus (pyoderma gangrenosum).

Yksikään yksittäinen tutkimus ei käy taudin toteamiseksi, vaan tarvitaan useita tutkimuksia. Oireiden lisäksi eniten käytetty diagnosoiva menetelmä on kolonoskopia biopsineen, mutta

terve skopialöydös ei kuitenkaan voi poissulkea Crohnin tautia, koska 27 %:lla tauti näkyy terminaalisisessa ileumissa, jonne kamera harvoin yltää. (4) (7)

Taudin lääkehoitoon voidaan käyttää kortikosteroideja, 5-aminosalisylaattia, biologisia lääkkeitä (infliksimabi ja adalimumabi), puriini johdannaisiin kuuluvia antimetaboliitteja (atsatiopriiniä ja 6-merkaptopuriinia) ja metotreksaattia. Suurin osa potilaista joutuu kuitenkin leikkaukseen 10 vuoden sisällä taudin puhkeamisesta. (7)

2.3 Haavainen koliitti

Haavainen koliitti on toinen tulehduksellisten suolistosairauksien tyyppi. Se vahingoittaa yhtenäisesti paksusuolen loppuosaa alkaen peräsuolesta, ja aiheuttaa tulehduksen paksusuolen limakalvolla. Tulehdus voi sijaita pelkästään peräsuolella, jolloin puhutaan proktiitista. Haavaisen koliitin tyypillisin oire on verinen ripuli. Muita oireita ovat limaiset ulosteet, vatsakipu ja joskus laihtuminen. Oireet voivat aika ajoin kadota kokonaan, mutta viikkojen tai vuosien jälkeen tauti useimmiten uusiutuu ja oireet palaavat. Kolmasosalla haavaista koliittia sairastavilla esiintyy ekstraintestinaalisia ilmenemismuotoja, kuten niveltulehduksia, primaarista sklerosoivaa kolangiittia ja haavautuvaa ihotulehdusta (pyoderma gangrenosum). Kuten Crohnin tauti, myös haavainen koliitti diagnosoidaan kolonoskopian koepalojen avulla. Lääkehoidossa käytetään samoja lääkkeitä kuin Crohnin taudissa, ja pelkkä proktiitti voidaan hoitaa peräpuikolla. Hoidon tarkoituksena on pitää potilas remissiossa ja ehkäistä paksusuolensyövän syntymistä. Jos remission ylläpitäminen on mahdotonta, tarvitaan jatkuvaa kortisonilääkitystä tai tauti komplisoituu, tehdään proktokolektomia ileoanaaliliitoksella, johon liitetään suolisäiliö (J-pussi). (8) (9)

2.4 TNF- α

Tuumorinekroositekijäalfa (TNF- α) on sytokiini, joka kuuluu TNF-superperheeseen. Se aiheuttaa tulehdusreaktiota. TNF- α tuottavat pääsääntöisesti monosyytit ja makrofagit,

mutta myös B- ja T-lymfosyytit, NK-solut, syöttösolut, sileä lihas ja tietyt tuumorisolulinjat voivat sitä erittää.

2.5 Biologiset lääkkeet

Infliksimabi on biologinen lääkeaine, jota käytetään tulehduksellisten suolistosairauksien, nivel- ja selkärankareuman sekä psoriaasin hoidossa. Se on kimeerinen monoklonaalinen IgG1-vasta-aine tuumorinekroositekijäalfalle, joka on tärkeä sytokiini kroonisissa tulehduksellisissa sairauksissa. Käyttökohteita infliksimabille löytyy koko ajan enemmän, mutta sitä ei yleensä käytetä ensisijaisena lääkkeenä. Lääkehoitoa aloittaessa annetaan 5mg/kg infuusioina suoneen viikoilla 0, 2 ja 6, jonka jälkeen lääkettä annetaan 8 viikon välein. (10)

Kuten suurimmalla osalla lääkkeistä, myös infliksimabilla on sivuvaikutuksia, joista tavallisin on infuusioalueen reaktiot. Muita sivuvaikutuksia ovat respiratoriset oireet sekä ihon reaktiot. Koska infliksimabi lamaa immuunijärjestelmää, niin myös infektioriski kasvaa, minkä johdosta opportunistiset ja latentit infektiot voivat sairastuttaa infliksimabin käyttäjän. Latentti tuberkuloosi voi reaktivoitua, minkä takia tuberkuloosi on syytä tarkistaa ennen hoidon aloittamista. Myös syöpäriski kasvaa, kun immuunipuolustusta muokataan. Sairastettu tai hoidossa oleva syöpä on kontraindikaatio. (10)

Istukan läpäisevyys infliksimabille nousee raskauden edetessä, jonka johdosta raskauden aikana infliksimabin käyttöä tulee välttää etenkin ensimmäisen trimesterin jälkeen (11).

Adalimumabi on toinen biologinen lääke, jota käytetään tulehduksellisissa suolistosairauksissa. Kuten infliksimabi, myös adalimumabi sitoutuu TNF- α :n, ja lieventää tulehdusreaktiota. Infliksimabi on hoidon alussa adalimumabia tehokkaampi, mutta vuoden hoidon jälkeen niiden tehot ovat samat. (12)

2.6 Infliksimabin hoitovaste

Infliksimabin suurin ongelma on, että vain osa potilaista saa jatkuvan vasteen lääkkeelle. Suuri osa potilaista ei reagoi lääkkeeseen ollenkaan (primääri non-responderi) tai menettää vasteen hoidon aikana (sekundaarinen vasteen menetys). 10–30% lääkkeen saajista on primäärejä non-respondereita, kun taas 23–46% menettää vasteen hoidon aikana. Suurin osa sekundaaristen vasteen menetyksistä johtuu anti-infliksimabin vasta-aineiden muodostumisesta (antiinfliximab antibodies, ATI). Vasta-aineiden läsnäolo veressä tuottaa immuunikomplekseja ja nopeuttaa lääkkeen eliminaatiota. Tästä johtuen potilailla, joilta löytyy ATI:a verestä, on alempi infliksimabin pitoisuus. Muutamissa tutkimuksissa immunomodulaattorin, kuten atsatiopriinin, 6MP:n tai metotreksaatin, rinnakkainen lääkitys vähentää ATI:en muodostusta ja parantaa vastetta. Potilaat, jotka muodostavat vasta-aineita infliksimabille, saavat suuremmalla todennäköisyydellä infuusioreaktion kuin he, joilta ei löydy ATI:a verestä (40% vs. 4.7%). (13) (14)

3 Tutkimuksen tavoitteet

Vaikka infliksimabin geneeriset lääkkeet ovat tulleet markkinoille, ovat ne silti kalliita. Jos löydettäisiin hyvä biomarkkeri ennustamaan infliksimabin hoitovastetta, välttyttäisiin turhilta sivuvaikutuksilta, ja kustannukset olisivat alhaisemmat. Tämän tutkimuksen tavoitteena on etsiä uusia biomarkkereita geeniekspressioprofiileista moderneilla RNA:n sekvensointimenetelmillä ja ymmärtää erilaisten lääkevasteiden eroja.

Tutkielmassa tutkitaan systemaattisesti veren valkosolujen geeniekspressiota IBD-potilailla ennen (0vk) ja jälkeen (12vk) infliksimabihoidon, sekä verrataan vasteensaajien ja ei-vasteensaajien geeniekspressioiden profiileja.

4 Tutkimusaineisto ja –menetelmät

4.1 Potilasaineisto

Tutkimusaineisto koostuu Crohnin ja haavaisen koliitin potilaista, jotka ovat antaneet luvan näytteiden analysointiin (eettinen lupanumero HUS 147/13/03/01/16). Potilaat ovat HUS Vatsakeskuksen potilaita, joille suunnitellaan biologisen hoidon aloittamista. Aloitettaessa hoitoa (0vk) otetaan potilaalta seerumi-, uloste- ja EDTA-näytteet. Jos infliksimabihoidon aloitus tiedetään jo ennen IBD-potilaiden endoskopiaa, otetaan myös biopsianäytteet tutkimusta varten. Viikoilla 2 ja 6 otetaan seerumi- ja ulostenäytteet. Viikoilla 12 ja 52 otetaan samat näytteet kuin viikolla 0. Veri- ja ulostenäytteet tulevat Tullinpuomin tai Kampin HUSLAB:sta, ja biopsiat Meilahden sairaalasta. 0 viikon näytteitä on 14 tässä tutkimuksessa, ja 12 viikon näytteitä 9. Näytteet käsitellään Päivi Saavalaisen ryhmässä Haartman instituutissa immunobiologian tutkimusohjelmassa.

Tutkimuksesta ei aiheutunut potilaille muuta rasitusta kuin veri- ja ulostenäytteiden antaminen. Heille ei myöskään koidu ylimääräisiä käyntejä gastroenterologian klinikalle. Tutkimusnäytteet ja kliiniset tiedot koodattiin anonymisti näytteidenkäsittelyn aikana.

4.2 Lääkevasteen luokittelu

Hoitovaste luokiteltiin asteikolla 1-3, perustuen hoitavien lääkäreiden arvioon. Hoitovaste 1 tarkoittaa, että potilaalla on hyvä hoitovaste infliksimabille, kun taas 3 tarkoittaa, että potilas ei reagoi lääkkeeseen. Hoitovaste 2 viittaa siihen, että potilas joko menettää saaneensa vasteen, tai reagoi vain osittain lääkkeeseen. Arviossa otettiin huomioon kliiniset testit, laboratorioarvot ja endoskopia löydökset. Käytettyjä kliinisiä testejä olivat Partial Mayo-, HBI- ja DSI-testit. Laboratoriokokeiden verikokeesta arviointiin käytettiin hemoglobiini-, leukosyytti-, trombosyytti-, neutrofiili-, lymfosyytti-, monosyytti-, CRP-, kreatiniini-, AFOS- ja ALAT-arvoja, ja ulostenäytteestä mitattiin kalprotektiinin arvo. Total

mayo-, SES-CD- ja UCEIS-testeissä käytettiin tähystyksessä tehtyjä löytöjä. Myös kliininen IBDQ-kysely tehtiin potilaalle viikoilla 0 ja 12.

Taulukko 1. Potilastunnisteet

Potilastunniste	Hoitovaste	Diagnoosi	Sukupuoli	0 viikon näyte	12 viikon näyte
PRO001	1	CD	Mies	X	X
PRO002	2	CD	Mies		X
PRO003	3	UC	Mies	X	
PRO005	1	UC	Mies	X	X
PRO006	1	UC	Mies	X	X
PRO008	1	UC	Mies	X	
PRO009	1	CD	Mies	X	
PRO010	1	UC	Mies	X	X
PRO011	2	CD	Nainen	X	X
PRO012	2	UC	Nainen	X	X
PRO013	2	Luokittelematon IBD	Nainen	X	X
PRO014	3	UC	Mies	X	
PRO015	2	CD	Nainen	X	
PRO016	3	CD	Mies	X	
PRO017	1	UC	Nainen	X	

5 Menetelmät

5.1 Valkosolunäytteiden käsittely

EDTA-näytteestä erotettiin perifeerisen veren mononukleaarisolut Ficoll gradienttisentrifugaatiolla (Leucosep Centrifuge Tubes, Greiner Bio-One, käyttäen väliainetta Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare), jonka jälkeen solut pestiin kahteen kertaan PBS:llä (pH 7.4). Erotellut valkosolut laskettiin ja sekoitettiin DMSO-FBS -liuokseen (1:9),

jonka jälkeen ampullit laitettiin hitaasti jäähdyttävässä isopropanolikammiossa $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -pakkaseen ja vuorokauden jälkeen siirrettiin $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 RNA-eristys ja cDNA-kääntö

Kun tarvittavat solunäytteet oli kerätty, sulatettiin ne jäällä. RNA eristettiin RNA-eristyskitillä (Qiagen, RNeasy Mini Kit) protokollaa noudattaen. Koska RNA:ta ei voi sekvensoida, täytyi se käänteiskopioida DNA:ksi (cDNA, complementary DNA), joka monistettiin ja puhdistettiin ennen sekvensoimista.

Kun RNA oli eristetty, määritettiin niiden konsentraatio fluorometrisesti Qubit-laitteella (Qubit 2.0 Fluorometer, ThermoFisher). Totaali-RNAn eheys ja laatu määritettiin LabChip-kapillaarielektroforeesilaitteella (LabChip GX Touch HT, PerkinElmer). Näytteet laimennettiin alle $5\text{ ng}/\mu\text{l}$, ja menetelmässä noudatettiin valmistajan protokollaa.

Eristetty RNA laimennettiin konsentraatioon $5\text{ ng}/\mu\text{l}$. $1,9\text{ }\mu\text{l}$ laimennetusta RNA:sta sekoitettiin puskuriin, jonka ainesosat on esitetty taulukossa 2. Indeksioligot olivat poly-T päätteisiä oligoita (Integrated DNA Technologies), joita oli 12 erilaisella indeksillä, jotta myöhemmin näytteet voitiin yhdistää riveittäin. Spike-in (ERCC RNA Spike-In Mix, ThermoFisher) on RNA-standardi, jota käytettiin positiivisessa kontrollissa.

Taulukko 2. Alkuseos

Substanssi	Määrä (μl)
Indeksioligo (IDT)	0,20
20mM dNTP (Bioline)	0,50
RiboLock RNase inhibitor (Fisher Scientific)	0,10
RNA	1,90
Spike-in (Thermo Fisher Scientific)	0,01
Yhteensä	2,71

Seosta inkuboitiin huoneenlämmössä viiden minuutin ajan. $2,4\text{ ng}/\mu\text{l}$ käänteiskopioijaentsyymisekoitusta (taulukko 3) lisättiin jokaiseen lähteeseen. Näytteet

inkuboitiin ensin 30 minuuttia 22 °C:ssa, jonka jälkeen 90 minuuttia 42 °C:ssa. Seoksessa oli mukana myös ns. Template Switch Oligo (TSO), jonka avulla cDNA:n toiseen päähän saatiin käännettyä universaali sekvenssi myöhempää PCR-monistusta varten.

Taulukko 3. Käänteiskopioijaentsyymisekoitus

Substanssi	Määrä (μl)
Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)	1,00
RiboLock RNase inhibitor (Fisher Scientific)	0,10
50 μM Template Switch Oligo (IDT)	0,25
Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)	0,25
5M betaiini (Sigma-Aldrich)	0,75
Yhteensä	2,40

5.3 cDNA:n monistus ja sekvensointikirjaston valmistus

10 μl PCR-sekoitusta (taulukko 4) lisättiin jokaiseen näytteeseen, jolloin kokonaistilavuudeksi tuli 15 μl. Näytteet pipetoitiin PCR-putkiin/liuskoihin. PCR-ohjelmana käytettiin 20 kierroksen ohjelmaa. PCR:n jälkeen konsentraatio ja laatu tarkistettiin LabChip:n avulla.

Taulukko 4. PCR-sekoitus

Substanssi	Määrä (μl)
2x Kapa HiFi Hotstart Readymix (Roche)	7,50
200 μM SMART PCR –primeeri (IDT)	0,06
Nukleasiton vesi	2,44
Yhteensä	10,0

5.4 Näytteiden yhdistäminen

Näytteet yhdistettiin riveittäin, jolloin 23 potilasnäytteestä tuli kaksi poolia, A ja B. Näytteiden määrä laskettiin Labchip:n konsentraation perusteella. PRO012 DNA-konsentraatio oli muita suurempi, joten siitä otettiin pienempi määrä. Jokaista näytettä otettiin 4,3μl, paitsi näytettä PRO012 otettiin 2,7μl suuremman konsentraation vuoksi. B-

pooliin lisättiin 2,7µl puhdasta vettä, jotta sekä A:n että B:n kokonaistilavuus oli 50µl. Näytteiden laatu tarkistettiin uudelleen LabChip:n avulla. Taulukossa 5 on lueteltu indeksinumerot ja oligosekvenssit (barcode).

Taulukko 5. Potilasnäytteiden indeksit

Potilasnumero	Oligosekvenssi/barcode	DropSeq-bulk-indeksi	Indeksi	Pooli
PRO001A	ACGTACGTACGT	1	N701	A
PRO003A	CGTACGTACGTA	2	N701	A
PRO005A	GTACGTACGTAC	3	N701	A
PRO006A	TACGTACGTACG	4	N701	A
PRO008A	ACGTCGTACGTA	5	N701	A
PRO009A	CGTAGTACGTAC	6	N701	A
PRO010A	GTACTACGTACG	7	N701	A
PRO011A	TACGACGTACGT	8	N701	A
PRO012A	ACGTGTACGTAC	9	N701	A
PRO013A	CGTATACGTACG	10	N701	A
PRO014A	GTACACGTACGT	11	N701	A
PRO015A	TACGCGTACGTA	12	N701	A
PRO016A	ACGTACGTACGT	1	N702	B
PRO017A	CGTACGTACGTA	2	N702	B
PRO001D	GTACGTACGTAC	3	N702	B
PRO002D	TACGTACGTACG	4	N702	B
PRO003D	ACGTCGTACGTA	5	N702	B
PRO005D	CGTAGTACGTAC	6	N702	B
PRO006D	GTACTACGTACG	7	N702	B
PRO010D	TACGACGTACGT	8	N702	B
PRO011D	ACGTGTACGTAC	9	N702	B
PRO012D	CGTATACGTACG	10	N702	B
PRO013D	GTACACGTACGT	11	N702	B

5.5 Puhdistus

Laadun tarkistamisen jälkeen cDNA:t puhdistettiin Agencourt AMPure XP:tä (Beckman Coulter) käyttäen seuraavasti:

1. Kuulat nostettiin huoneenlämpöön 30 minuuttia ennen aloitusta.
2. 30 µl AMPure-kuulia sekoitettiin DNA-low-bind –putkessa 50 µl cDNA:n kanssa.

3. Putkia sekoitettiin muutama sekunti vorteksisekoittajalla, ja inkuboitiin viiden minuutin ajan huoneenlämmössä.
4. Putket siirrettiin magneettirekkiin kolmen minuutin ajaksi.
5. Supernatantti poistettiin varovasti.
6. Kuulat pestiin kahteen kertaan tuoreella 70%:lla etanolilla.
7. Kaikki etanoli poistettiin putkesta ja putken annettiin olla auki vähintään kolmen minuutin ajan, jotta etanoli haihtui.
8. Putki otettiin pois magneettirekistä ja 10 µl ddH₂O lisättiin siihen.
9. Putket siirrettiin magneettirekkiin kolmen minuutin ajaksi.
10. Supernatantti siirrettiin uuteen puhtaaseen putkeen ja konsentraatio mitattiin.

5.6 Tagmentaatio

DNA:n pilkkomiseen käytettiin Nextera XT DNA Library Preparation –kittiä (Illumina), joka pilkkoi DNA:n sopivan pituisiksi ja lisäsi adapterit Illumina-sekvensointia varten. Pilkkominen tehtiin seuraavasti:

1. PCR-laite esilämmitettiin 55°C.
2. 600pg DNA:ta sekoitettiin veteen niin, että kokonaistilavuudeksi tuli 9µl.
3. 10µl Nextera TD –puskuria ja 1µl Amplicon Tagment –entsyymiä lisättiin, jolloin reaktio käynnistyi.
4. Seos sekoitettiin pipetoimalla ja inkuboitiin 55°C:ssa viiden minuutin ajan
5. Jotta reaktio loppuisi, lisättiin 5µl neutralisaatiopuskuria ja sekoitettiin pipetoimalla.
6. Näytettä inkuboitiin viisi minuuttia huoneenlämmössä.

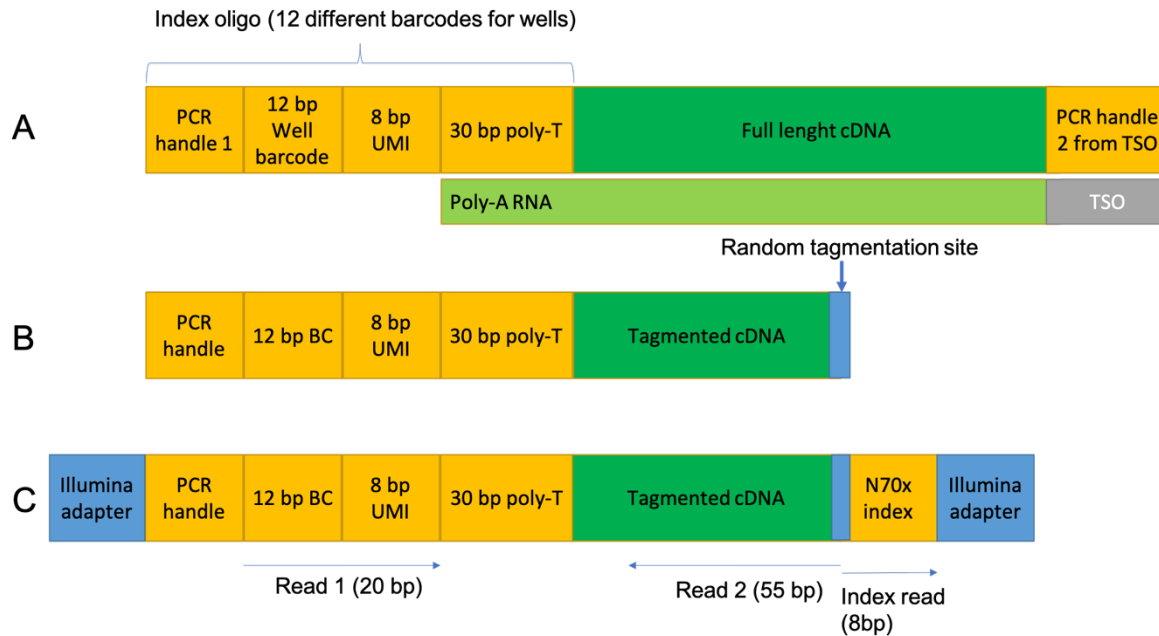
7. Uuden PCR-reaktion aikaansaamiseksi edellä valmistettuun 25 µl seokseen lisättiin 15 µl Nextera PCR –reagenssia, 8 µl vettä, 1 µl New-P5-SMART PCR hybrid -oligoja ja 1 µl 10 µM Nextera N70X -oligoja (tässä järjestyksessä).

8. PCR ajettiin seuraavalla ohjelmalla:

Kierroksia	Lämpöaste	Aika (min)
1x	95°C	0:30
12x	95°C	0:10
	55°C	0:30
	72°C	0:30
1x	72°C	5:00
1x	4°C	∞

9. Näytteet puhdistettiin kahteen kertaan käyttäen AMPure XP -kuulia. Ensimmäisellä kerralla DNA:han uutettiin 30µl vettä, toisella eli viimeisellä kerralla 10µl.

10 µM Nextera N70X –oligot ovat indeksejä sekvensointia varten. Näyte A sai indeksin N701, ja näyte B N702.



Kuva 1. Sekvensointikirjaston rakenne ja päävaiheet. A. Poly-A mRNA käännettiin kokopitkäksi cDNAksi indeksioligon avulla, jossa universaali PCR-sekvenssijakso, kuoppakohtainen 12bp tunnistesekvenssi, 8bp molekyylitunniste (UMI), sekä 30bp poly-T jakso. cDNA:n toiseen päähän luotiin toinen universaali PCR sekvenssijakso templaatinvaihto-oligon avulla (TSO). Kokopitkä cDNA monistettiin tämän jälkeen kaikista ilmentyneistä geneistä universaalien PCR-alukkeiden avulla. B. Monistettu cDNA tagmentoitiin transposaasientsyymillä, joka pilkkoi cDNA:n sattumanvaraisista kohdista ja lisäsi vakioalukkeen pilkkomiskohtaan. C. Tagmentoitu cDNA tuote rikastettiin geenin 3' päästä uudella PCR-reaktiolla, jossa lisättiin myös lopulliset Illumina adapterit, sekä näytteiden poolauksen sekvensointireaktioon mahdollistavat N70x indeksit.

Sekvensointiin käytettiin Illumina kittiä (NextSeq 500/550 High Output v2 kit [75 cycles]) ja NextSeq500-sekvensaattoria Meilahden Functional Genomics Unit –palveluyksikössä (FuGU). Saatu raakadata analysoitiin ja linjattiin ihmisgenomia kohtaan (TopHat2) CSC:n Chipster ohjelmiston (<https://chipster.csc.fi>) bioinformatiikkaprotokollalla, joka tuotti matriisin kaikkien ihmisgeenien RNA-ekspressiotasoista kussakin potilasnäytteessä.

(taulukko 6). Vasteryhmien välisten ekspressioerojen merkitsevyyttä mitattiin Chipsterin edgeR-DE-analyysityökalulla (differential expression).

Taulukko 6. Chipster:n polku

Download file from URL directly to server
List contents of a tar file
Extract .tar or .tar.gz file
Merge FASTQ
Preprocessing DropSeq FASTQ files (tässä kohdassa valittiin Base range for cell barcodes 2-11 laadun parantamiseksi)
TopHat2 for single end reads
Merge BAM alignment
Tag read with gene exon
Digital expression

Sekvensointi antoi tuloksia, jossa oli N yhden nukleotidin tilalla. N tarkoittaa, että sekvensaattori ei osannut lukea nukleotidia. Myös väärin luettuja ensimmäisiä ja viimeisiä nukleotidejä löytyi. Koska tunnistesekvenssillä on 12 nukleotidia, ja ne ovat kokonaisuudeltaan suhteellisen erilaisia, jätettiin Chipster-analyysissä tunnistesekvenssistä ensimmäinen ja viimeinen nukleotidi pois, jolloin vain paikan 2-11 nukleotidit luettiin tunnistesekvenssistä. Tällöin geenejen lukumäärä ja UMI:t (unique molecular identifier, uniikki molekyylitunniste) nousi, ja tunnistesekvenssit, jotka olivat muuten 12 tunnistesekvenssin näköisiä, mutta sisälsivät N-nukleotidin, vähenivät. Taulukoissa 7 ja 8 näkyy näytteiden geenien ja UMI:en lukumäärät kahdelletoista ja kymmenelle nukleotidille.

Taulukko 7. A-näytteen tunnistesekvenssien geenien ja UMI:n lukumäärät

DropSeq-bulk-indeksi	A-näytteen tunnistesekvenssi (12 nukleotidia)	Geenien lukumäärä	UMI	A-näytteen tunnistesekvenssi (10 nukleotidia, sillä ensimmäinen ja viimeinen jätetty pois)	Geenien lukumäärä	UMI
12	TACGCGTACGTA	15780	650961	ACGCGTACGT	16257	748807
9	ACGTGTACGTAC	14954	515632	CGTGTACGTA	15471	624516

2	CGTACGTACGTA	17082	494193	GTACGTACGT	18071	599725
7	GTACTACGTACG	16376	468917	TACTACGTAC	17275	559861
4	TACGTACGTACG	15678	424594	ACGTACGTAC	16526	507930
8	TACGACGTACGT	14253	399722	ACGACGTACG	14649	466485
5	ACGTCGTACGTA	15151	398157	CGTCGTACGT	16246	486531
10	CGTATACGTACG	14328	374203	GTATACGTAC	14853	445972
3	GTACGTACGTAC	13468	326999	TACGTACGTA	13768	373949
11	GTACACGTACGT	15380	322584	TACACGTACG	16498	393229
6	CGTAGTACGTAC	13662	229232	GTAGTACGTA	14702	281192
1	ACGTACGTACGT	12754	89142	CGTACGTACG	14997	135617

Taulukko 8. B-näytteen tunnistesekvenssien geenien ja UMI:n lukumäärät

DropSeq-bulk-indeksi	B-näytteen tunnistesekvenssi (12 nukleotidia)	Geenien lukumäärä	UMI	B-näytteen tunnistesekvenssi (10 nukleotidia, sillä ensimmäinen ja viimeinen jätetty pois)	Geenien lukumäärä	UMI
10	CGTATACGTACG	17627	1316190	GTATACGTAC	17627	1318600
11	GTACACGTACGT	17221	1010465	TACACGTACG	17235	1013050
1	ACGTACGTACGT	17287	988042	CGTACGTACG	17436	1017762
9	ACGTGTACGTAC	15305	819193	CGTGTACGTA	15527	860393
8	TACGACGTACGT	17327	729797	ACGACGTACG	17344	732067
7	GTACTACGTACG	16500	510378	TACTACGTAC	16517	511816
4	TACGTACGTACG	15486	420455	ACGTACGTAC	15501	422226
2	CGTACGTACGTA	14463	321003	GTACGTACGT	14492	323035
6	CGTAGTACGTAC	12541	201979	GTAGTACGTA	12570	202696
3	GTACGTACGTAC	12657	193195	TACGTACGTA	12695	194942

6 Tulokset

6.1 Geeniekspressioiden vertailua

Analyysissä käytettiin CSC:n Chipster data-analyysi-ohjelmistoa ja aikaisemmin mainittua polkua (taulukko 6) seurattiin. Aikapisteiden geenit jaettiin eri ryhmiin, ja niiden geeniekspressioeroja analysoitiin. 0 viikon profiileja verrattiin, eikä yksikään geeni ilmentynyt merkitsevästi eri tavoin eri vasteryhmissä. Tämä tarkoittaa, että tämän tutkimuksen perusteella ei veren valkosolujen geeniekspressiolla voi ennen hoidon aloittamista ennustaa onko hoitovaste täydellinen vai osittainen.

Vertailemalla 0 viikon ja 12 viikon geenien ekspressiota kaikkien näytteiden välillä, antoi Chipsterin DE-analyysi tulokseksi 17 geeniä. Näistä 17 geenistä seitsemän geenin ilmentyminen nousi tai laski eniten, ja näiden geenien merkitsevyys- ja ilmentymisarvot näkyvät alla olevassa taulukossa (taulukko 9). Positiivinen logFC 1,23 tarkoittaa, että geeni ilmentyy $2^{1,23}$, eli 2,34kertaa vahvemmin 12 viikon aikapisteessä verrattuna 0 viikon aikapisteeseen. Näistä DUSP2-geeni oli jokaisessa näytteessä ylimpien joukossa.

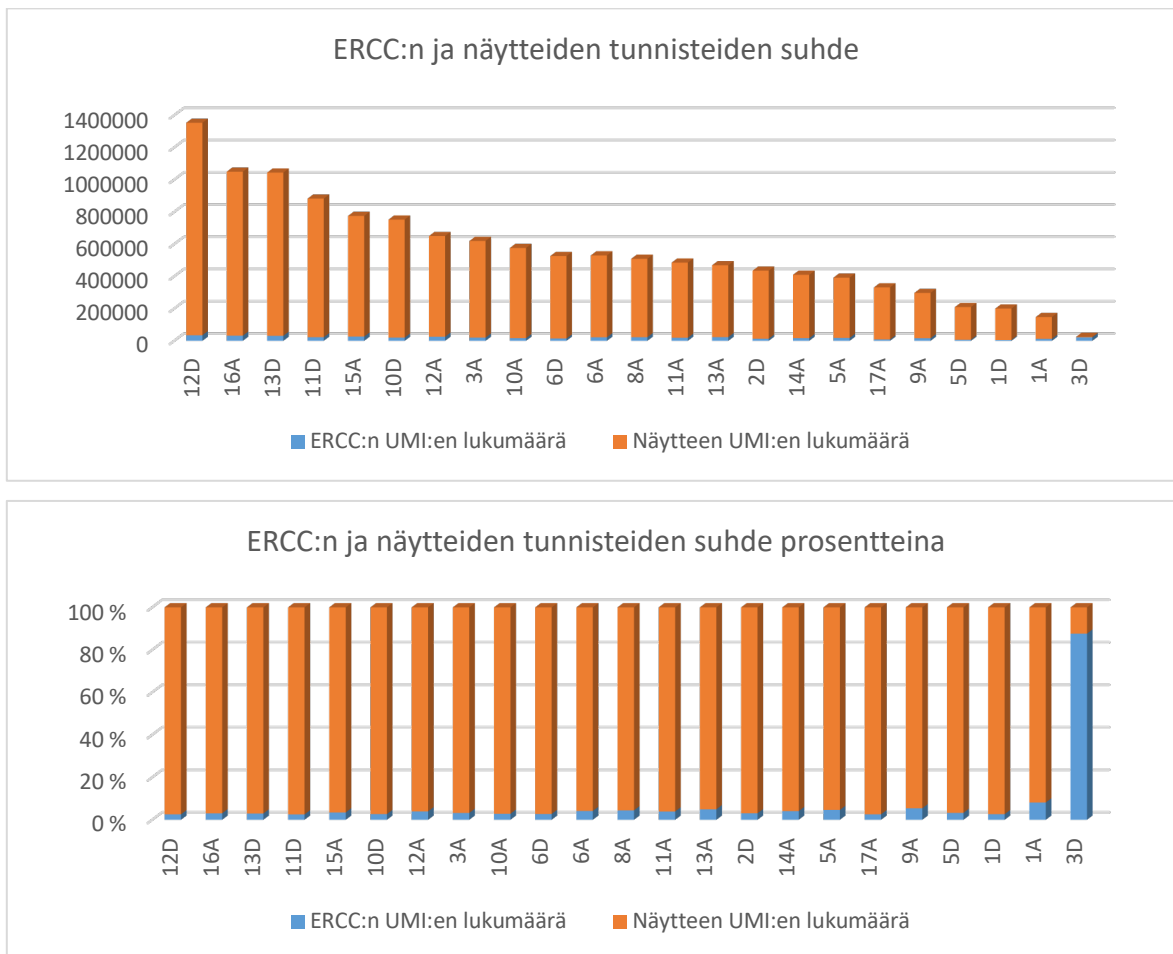
Taulukko 9. edgeR DE-analyysissä löytyneet 7 merkitsevintä geeniä. FC=fold change; CPM=counts per million; FDR=false discovery rate

Geenin nimi	logFC	logCPM	P-arvo	FDR
DUSP2	1,23	8,31	5,58E-06	0,0123
IFITM1	1,04	6,95	1,91E-05	0,0167
IFITM2	1,03	8,60	2,13E-05	0,0170
CRLS1	-1,10	4,29	7,12E-05	0,0429
NFIA	-1,81	3,62	1,47E-05	0,0161
TMSB4XP2	1,06	6,04	3,64E-05	0,0267
ZNF451	-1,13	5,31	3,86E-06	0,0123

6.2 ERCC

Spike-in-kontrollia käytettiin geenien suhteellisen lukumäärän vertailuun. Koska kontrollia laitettiin jokaiseen näytteeseen, voitiin kontrollin ja näytteen geenilukumäärää verrata. PRO003D antoi huonon tuloksen PCA-testissä ja kontrollin ja näytteen suhde oli muita

huomattavasti suurempi. Kyseisen näytteen LabChip:n RNA-käyrät ja Qubit:lla mitattu konsentraatio ei eronnut muista. Koska PRO003D:n ERCC:n UMI:en lukumäärä on samaa luokkaa muiden kanssa, on jotain tapahtunut näytteelle (RNA ehkä hajonnut) ennen kontrollin lisäämistä, eikä sitä näin ollen voi ottaa mukaan analyysiin. Taulukossa 10 ja kuvaajissa 1 A) ja B) näkee kontrollin ja näytteen UMI:en suhteen.



Kuvaaja 1. ERCC:n ja näytteiden tunnisteiden A) lukumäärän suhde ja B) suhde prosentteina

Taulukko 10. ERCC:n ja näytteiden UMI:en lukumäärät

PRO-näyte	ERCC:n UMI:en lukumäärä	Näytteen UMI:en lukumäärä	ERCC:n osuus näytteestä (%)
12D	34648	1318600	2,56
16A	31944	1017762	3,04
13D	31066	1013050	2,98

11D	22394	860393	2,54
15A	26744	748807	3,45
10D	20155	732067	2,68
12A	25698	624516	3,95
3A	20061	599725	3,24
10A	16468	559861	2,86
6D	14401	511816	2,74
6A	22026	507930	4,16
8A	22615	486531	4,44
11A	19021	466485	3,92
13A	23170	445972	4,94
2D	13337	422226	3,06
14A	16736	393229	4,08
5A	18261	373949	4,66
17A	8494	323035	2,56
9A	16056	281192	5,40
5D	6849	202696	3,27
1D	5298	194942	2,65
1A	11995	135617	8,13
3D	21924	3096	87,63

6.3 Poikkeavat geenit

Niistä 17 geenistä, jotka tulivat esiin DE-analyysissä aikapisteiden välillä, piirrettiin kuvaajat vasteensaajien näytteistä, joilla oli sekä 0 että 12 viikon näytteet. Kuvaajassa 2 on esitetty seitsemän geenä, joiden ilmentyminen joko nousi tai laski kahden aikapisteen välillä kaikkein eniten. Nämä geenit olivat DUSP2, IFITM1, IFITM2, CRLS1, NFIA, TMSB4XP2 ja ZNF451. Taulukosta näkee, että DUSP2, IFITM1, IFITM2 ja TMSB4XP2 ovat tulleet aktiivisemmiksi, kun taas CRLS1, NFIA ja ZNF451 vaimentuivat lääkehoidon aikana.

DUSP2-geeni (dual specificity phosphatase 2) koodaa fosfataasi-entsyymiä, joka säätelee negatiivisesti MAP-kinaasin superperhettä, joka puolestaan säätelee solujen proliferaatiota ja differentiaatiota. IFITM1 ja 2 -geenit (interferon induced transmembrane protein 1 & 2) koodaavat mm. virusinfektioissa indusoituvia kalvoproteiineja. CRLS1 (cardiolipin synthase 1) on geeni, joka koodaa fosfatidyyli transferaasientsyymiä. Entsyymi katalysoi kardiolipidin

synteesiä, joka on fosfolipidi mitokondrion kalvossa. NFIA (nuclear factor I A) on geeni, joka koodaa tumafaktorin transkriptiotekijää. TMSB4XP2 (thymosin beta 4, X-linked pseudogene 2) on pseudogeeni, joka ei liene funktionaalisesti merkityksellinen koska ei koodaa proteiinia. ZNF451 (zinc finger protein 451) toimii transkription säätelijänä ja vaimentaa mm. TGF-betan (transforming growth factor beta) signalointia. (15)

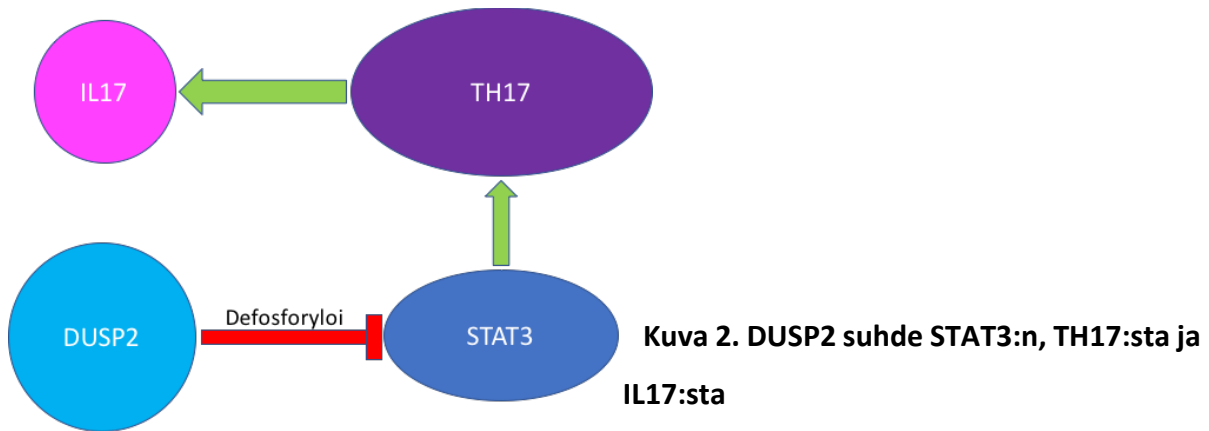
6.4 DUSP2-geeni

DUSP2-geenillä on yhteyttä IBD:hen. DUSP2 on fosfataasi, joka säätelee STAT3 (signal transducer and activator 3) transkriptiofaktorin aktiivisuutta ja Th17-solun erilaistumista. DUSP2 muodostaa homodimeerin itsensä kanssa tai heterodimeerin DUSP1 tai DUSP4 kanssa, jolloin STAT3 defosforyloituu ja inaktivoituu. Aktivoituneena STAT3 aktivoi Th17-solun, jolloin interleukiini (IL-)17 vapautuu ja tulehdusreaktio voimistuu. Näin ollen DUSP2 säätelee negatiivisesti Th17-solun kehitystä heikentämällä STAT3-geenin aktiivisuutta, ja hillitsee tulehdusreaktiota.

Lu et al. tutkimuksessa DUSP2-negatiivisille ja -positiivisille hiirille aiheutettiin koliitti antamalla 3 %:sta dekstraanisulfaattinatriumia (DSS, dextran sulfate sodium). DUSP2-negatiivisille hiirille kehittyi vakavampi koliitti DUSP2-positiivisiin verrattuna. DUSP2-negatiiviset hiiret myös laihtuivat kaksi viikkoa verrokkia nopeammin, ja niillä oli suurempi määrä IL-17+CD4+T-soluja paksusuoleessa. (16)

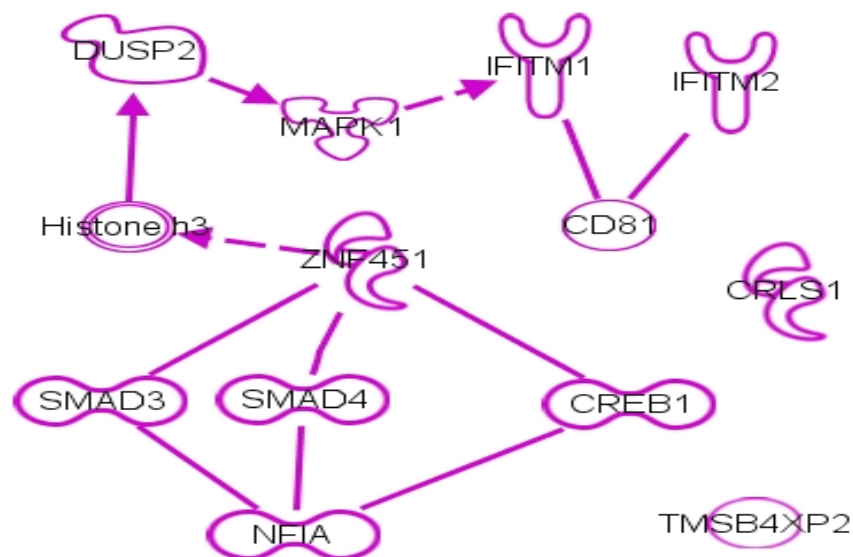
6.5 Th17-solu

T-auttajasolu 17 (Th17, T-helper cell 17) on CD4+-T-solu, joka tuottaa interleukiini-17 (IL-17). IL-17 on tulehdusreaktiota edistävä sytokiini, joka aiheuttaa tulehdusta eri kudoksien stroomasoluissa. Tulehdusreaktion lisäksi IL-17 rekrytoi kudokseen leukosyyttejä, etenkin neutrofiilejä, luoden näin linkin hankitun ja synnynnäisen immunitetin välille. Th17-solut ovat aktiivisia immuunivälitteisissä taudeissa, kuten IBD:ssä, psoriasiksessa, nivelreumassa, MS-taudissa ja astmassa. (17)



6.6 Signaaliointi

Seitsemän yllämainitun geenin yhteyksiä toisiinsa tarkasteltiin IPA:n (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen) avulla. NFIA vaikuttaa epäsuorasti ZNF451:een, joka puolestaan vaimentaa histoni 3:n (H3) asetylaatiota. H3 sitoutuu DUSP2:een, joka vaikuttaa epäsuorasti MAPK1 kautta IFITM1-geeniin kohottamalla sen ilmentymistä. IFITM1 ja IFITM2 sitoutuvat molemmat CD81-proteiiniin. CRLS1- ja TMSB4XP2-geeneille ei ole löydetty mitään yhteyttä näihin geeneihin.

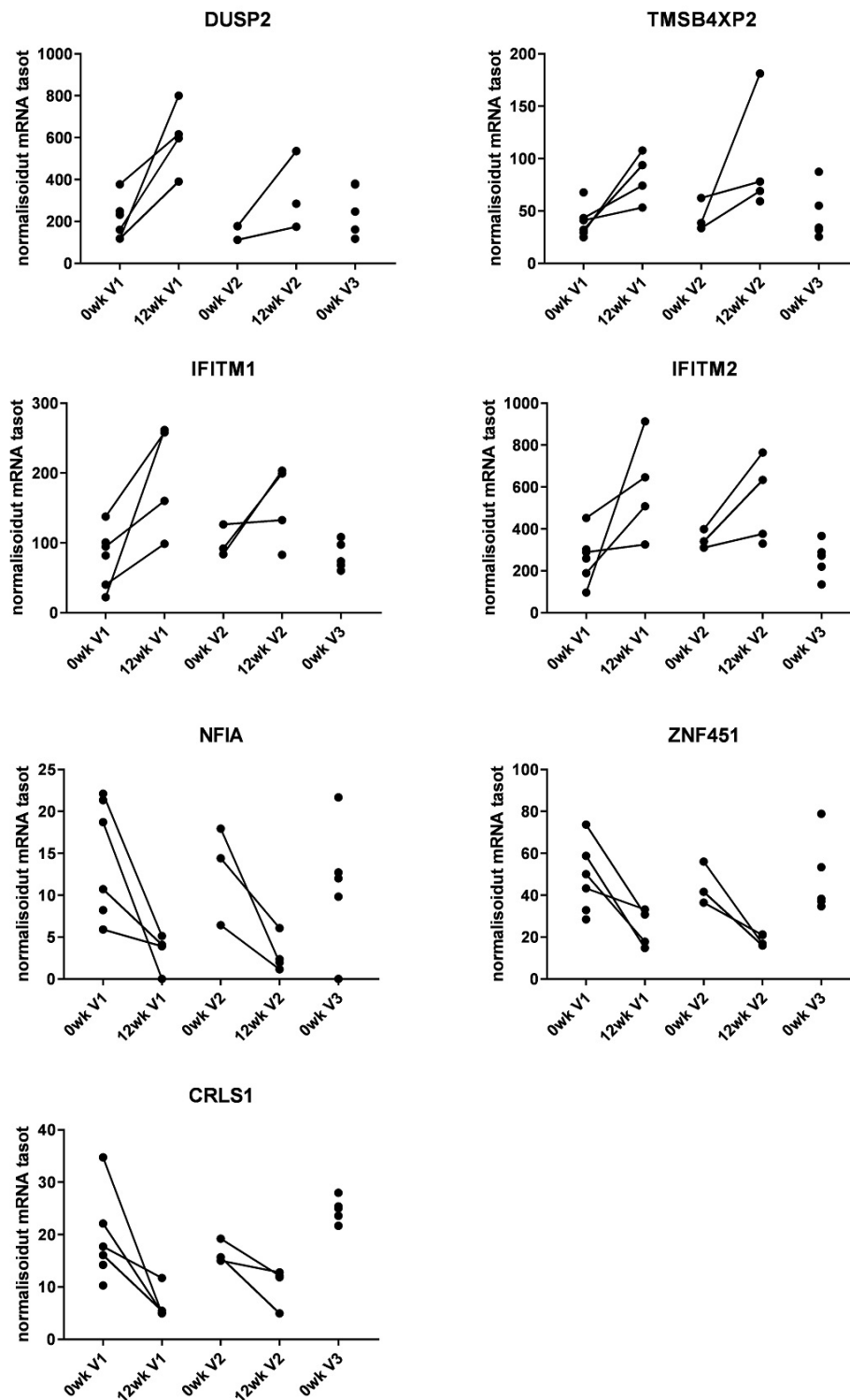


© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

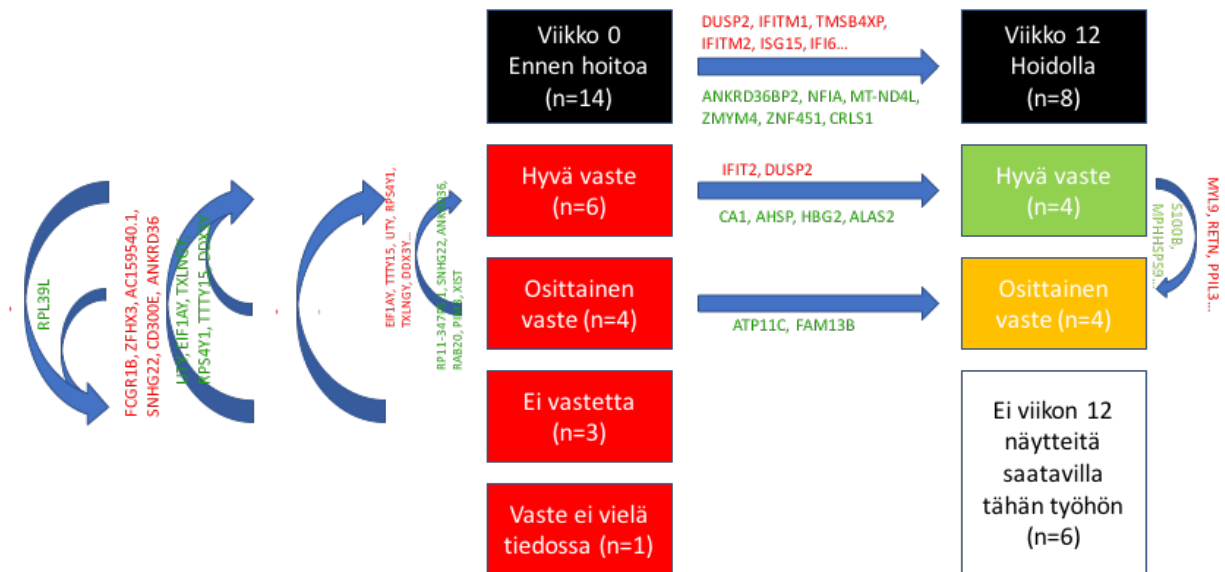
Kuva 3. Geenien yhteydet signaaliinnissa (Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN)

6.7 Geeniekspressioiden erot hoidon alussa ja 12 viikolla

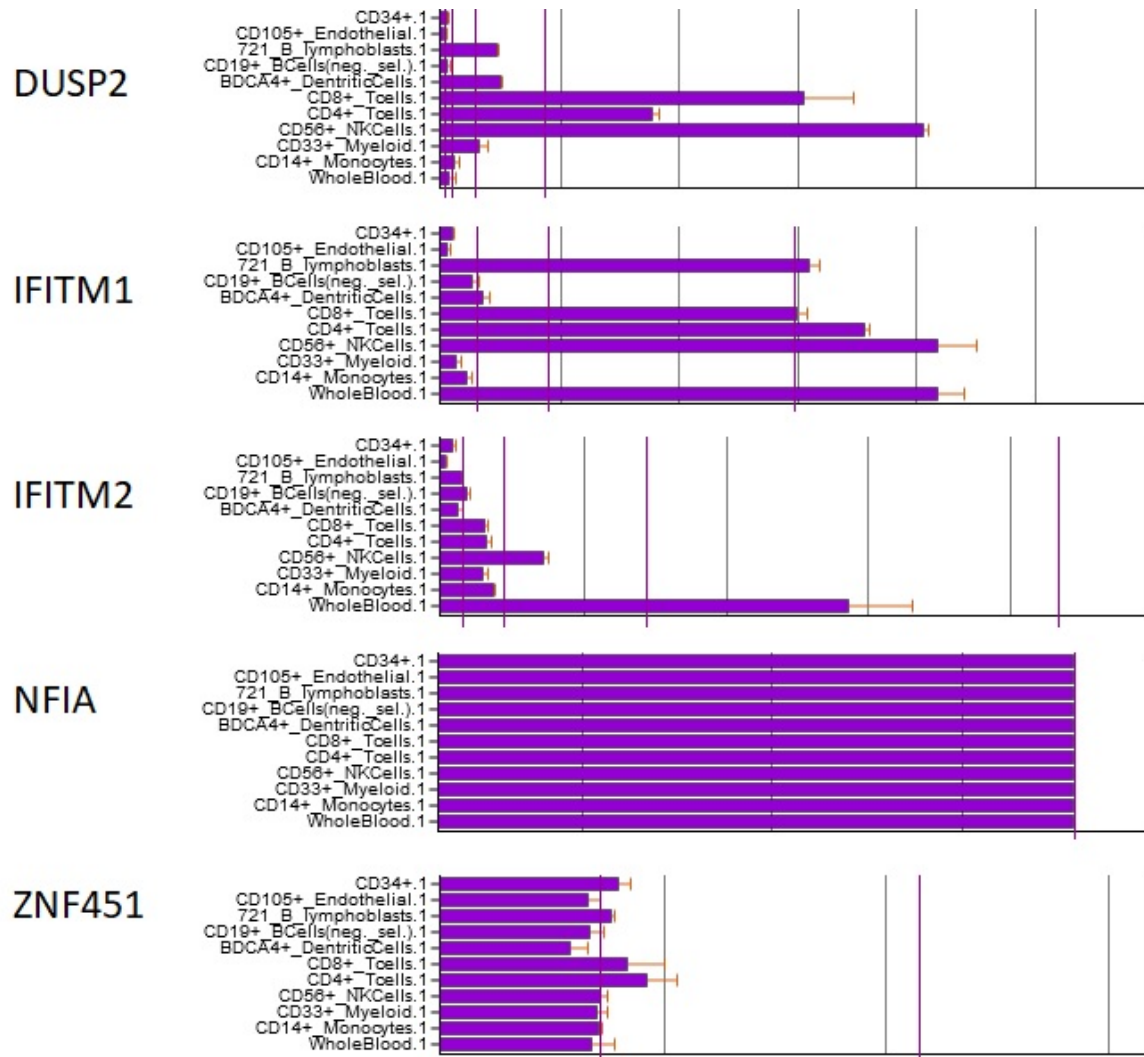
Alla olevissa kuvaajissa (kuvaaja 2 A-G) näkyy, miten näiden seitsemän geenin normalisoidut arvot muuttuivat 0 viikon (0) ja 12 viikon (1) välillä. Mitään tiettyä tyyliä ei näkynyt niiden, jotka saivat hyvän vasteen (sininen) ja niiden, jotka saivat jonkinlaisen vasteen (musta) välillä. Näin ollen DUSP2-geenin ilmentyminen ei korreloi hoitovasteen kanssa. Varmaksi tätä ei voi sanoa, sillä huonon hoitovasteen 12 viikon näytteitä ei ollut mukana tässä tutkimuksessa, koska seurantanäytteitä ei oltu vielä heiltä kerätty. Geeniekspressioerot voivat johtua myös siitä, että hoito vaikuttaa eri solutyypin määrään verinäytteissä. Kuvassa 5 on esitetty BioGBS-tietokannan mukaan näiden geenien ekspressiotasot eri valkosolutyypeissä, mistä nähdään, että etenkin DUSP2 ja IFITM1 ekspressoituvat huomattavasti voimakkaammin T-soluissa verrattuna monosyytteihin ja B-soluihin. Siten näiden solujen määrä näytteissä suhteessa toisiinsa voi vaikuttaa tutkimuksessa nähtyihin geeniekspressioeroihin näytteiden välillä.



Kuvaaja 2. Seitsemän merkitsevimmän geenin normalisoidut ekspressiotasot 0 ja 12 viikon kohdalla. V1 = hyvä vaste lääkehoidolle, V2 = osittainen vaste lääkehoidolle ja V3 = ei vastetta lääkehoidolle.



Kuva 4. Yhteenvetokaavio. Punaisella on merkitty geenit, joiden ilmentyminen nousi nuolen osoittamaan suuntaan, kun taas vihreällä ne geenit, joiden ilmentyminen laski.



Kuva 5. Merkitsevien geenien ilmentyminen veren eri valkosolutyypeissä BioGBS tietokannan mukaan (<http://biogbs.org>). TMSB4XP2 ja CRLS1 geeneille tietoja ei löytynyt.

7 Pohdinta

Tutkielman tulokset osoittivat, että infliksimabihoito vaikuttaa DUSP2-, IFITM1-, IFITM2-, CRLS1-, NFIA-, TMSB4XP2- ja ZNF451-geenien ilmentymiseen veren mononukleaarisolussa. DUSP2-geenin yhteys IBD:hen on havaittu jo aiemmin, ja tämä tutkielma viittasi infliksimabin vaikuttavan DUSP2-geenin ilmentymiseen, ja näin ollen myös IBD:hen. DUSP2 säätelee STAT3 defosforylaatiota ja sen myötä Th17 solujen erilaistumista ja toimintaa. Tämä voisi selittää osaltaan infliksimabin vaikutusmekanismeja immuunivasteen säätelijänä, joskin se miksi ja miten TNF-alfan inhibointi nostaa DUSP2 ekspressiota, vaatii lisätutkimuksia. Tarkempia jatkotutkimuksia kuten virtaussytometriaa ja yksisoluanalyysijä on myös tehtävä osoittaaksemme sen, nostaako infliksimabi T-solujen ekspressoimaa DUSP2:n määrä vai ylipäänsä T-solujen suhteellista määrää mononukleaarisolussa, joka sekin voisi selittää ekspressioerot hoidon aikana. Tätä puoltaa se, että BioGPS tietokannan mukaan DUSP2:n ekspressiotasot ovat huomattavasti korkeammat T-soluissa verrattuna B-soluihin ja monosyytteihin. Tiedetään, että infliksimabihoito vähentää monosyyttien määrää veressä vasteensaajilla (16). Siten monosyyttien määrän laskiessa T-solujen suhteellinen osuus suurenee vääjäämättä ja DUSP2 ja muiden T-soluissa ilmentyvien geenien kohonnut ekspressio voisi selittyä myös sillä.

Tutkielmaan käytettyjen näytteiden määrä oli liian pieni tulosten ollakseen tilastollisesti merkittäviä, koska mukaan ei vielä saatu 12 viikon näytteitä potilailta, jotka eivät ole saaneet minkäänlaista vastetta hoidolle. Tutkimuksen tuloksista voidaan kuitenkin tehdä alustava johtopäätös, että infliksimabi vaikuttaa edellä mainittujen geenien ilmentymiseen, mutta geeniekspressiot ennen hoitoa eivät korreloi hoitovasteen kanssa. Vasteensaajilla ja osittaisen vasteensaajilla ei näkynyt huomattavaa eroa geenien ilmentymisessä. Näin ollen RNA-sekvensointia ei voida käyttää biomarkkerina infliksimabin vasteen arviointiin, kun kyseessä on täydellinen ja osittainen hoitovaste.

Tulevaisuudessa tutkimusta voi jatkaa suurentamalla näytteiden lukumäärää, ja varmistamalla, että kaikkia vasteensaajia on riittävästi. Kun näytteiden lukumäärä on

suurempi, voi myös verrata Crohnin taudin ja haavaisen koliitin hoitovastetta ja vertailla niiden geeniekspressioiden eroja. Tässä tutkimuksessa käytettiin veren valkosoluja, ja vastaisuudessa voi saman tutkimuksen tehdä suolen koepaloista, jossa todellinen tulehdus on. Jatkossa kannattaa tutkia Th17-solujen, monosyyttien sekä muiden valkosolujen määriä hoidon aikana, sekä löytyneiden geenien ekspressiota tarkemmin eri soluissa virtausytometrisesti, yksisolusekvensoinnilla (single cell sequencing) ja kudosisäilytyksellä.

Lähdeluettelo

- (1) Jussila A, Virta LJ, Salomaa V, Mäki J, Jula A, Färkkilä MA. High and increasing prevalence of inflammatory bowel disease in Finland with a clear North-South difference. *J Crohns Colitis* 2013 Aug;7(7):256.
- (2) Virta LJ, Saarinen MM, Kolho K. Inflammatory Bowel Disease Incidence is on the Continuous Rise Among All Paediatric Patients Except for the Very Young: A Nationwide Registry-based Study on 28-Year Follow-up. *J Crohns Colitis* 2017 Feb;11(2):150-156.
- (3) Lehtinen P, Pasanen K, Kolho K, Auvinen A. Incidence of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Finland: An Environmental Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016 Jul;63(1):65-70.
- (4) Ranasinghe IR, Hsu R. Crohn Disease. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017.
- (5) Boyapati R, Satsangi J, Ho G. Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Rep* 2015 -4-02;7.
- (6) Richards RJ. Management of abdominal and pelvic abscess in Crohn's disease. *World journal of gastrointestinal endoscopy* 2011 Nov 16;;3(11):209.
- (7) Ha F, Khalil H. Crohn's disease: a clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2015 Nov;8(6):352-359.
- (8) Garud S, Peppercorn MA. Review: Ulcerative colitis: current treatment strategies and future prospects. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2009 Mar;2(2):99-108.
- (9) Ungaro, Ryan, MD | Mehandru, Saurabh, MD | Allen, Patrick B, MD | Peyrin-Biroulet, Laurent, Prof | Colombel, Jean-Frédéric, Professor. Ulcerative colitis. *Lancet, The* 2016;389(10080):1756-1770.
- (10) Uyanikoglu A, Ermis F, Akyuz F, Pinarbasi B, Baran B, Aydogan T, et al. Infliximab in inflammatory bowel disease: attention to adverse events. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014 Aug;18(16):2337-2342.
- (11) Djokanovic N, Klieger-Grossmann C, Pupco A, Koren G. Safety of infliximab use during pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2011 July 1;;32(1):93-97.
- (12) Thorlund K, Druyts E, Mills EJ, Fedorak RN, Marshall JK. Adalimumab versus infliximab for the treatment of moderate to severe ulcerative colitis in adult patients naïve to anti-

TNF therapy: an indirect treatment comparison meta-analysis. J Crohns Colitis 2014 Jul;8(7):571-581.

(13) Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel J. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. Clinical and translational gastroenterology 2016;7:e135.

(14) Jossen J, Dubinsky M. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. Curr Opin Pediatr 2016 Oct;28(5):620-625.

(15) GeneCards®: The Human Gene Database. Available at: <http://www.genecards.org>.

(16) Lu D, Liu L, Ji X, Gao Y, Chen X, Liu Y, et al. The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates TH17 differentiation. Nat Immunol 2015 Dec;16(12):1263-1273.

(17) Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. Immunological Reviews 2008 Jun 1;223(1):87-113.

(16) Slevin SM, Dennedy MC, Connaughton EP, Ribeiro A, Ceredig R, Griffin MD, Egan LJ. Infliximab Selectively Modulates the Circulating Blood Monocyte Repertoire in Crohn's Disease. Inflamm Bowel Dis. 2016 Dec;22(12):2863-2878.